

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/13782

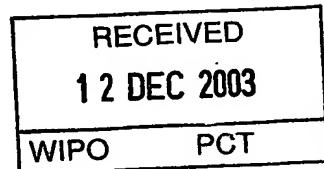
28.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 6月 2日

出願番号  
Application Number: 特願 2003-156306  
[ST. 10/C]: [JP 2003-156306]



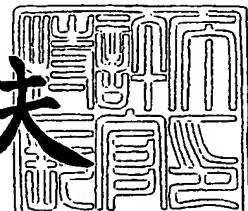
出願人  
Applicant(s): 武田薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2003-3098508

【書類名】 特許願  
【整理番号】 B03126  
【提出日】 平成15年 6月 2日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 38/00  
**【発明者】**  
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代3丁目12-1-305  
【氏名】 岩本 圭司  
**【発明者】**  
【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7-9-801  
【氏名】 片山 望  
**【発明者】**  
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代3丁目12-1-612  
【氏名】 河村 美穂子  
**【特許出願人】**  
【識別番号】 000002934  
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社  
**【代理人】**  
【識別番号】 100114041  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高橋 秀一  
**【選任した代理人】**  
【識別番号】 100106323  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 関口 陽  
**【先の出願に基づく優先権主張】**  
【出願番号】 特願2002-314041  
【出願日】 平成14年10月29日  
【整理番号】 B02351

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 0203423

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】SGLTホモログ用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

【請求項2】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

【請求項3】食後過血糖改善剤である請求項1または2記載の剤。

【請求項4】糖尿病または高脂血症予防・治療剤である請求項1ないし3記載の剤。

【請求項5】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログの活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤。

【請求項6】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤。

【請求項7】グルコースの吸収促進剤である請求項5または6記載の剤。

【請求項8】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログが配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項1ないし7記載の剤。

【請求項9】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログが配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項1ないし7記載の剤。

【請求項10】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログが配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項1ないし7記載の剤。

【請求項11】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

【請求項12】食後過血糖改善剤である請求項11記載の剤。

【請求項13】糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である請求項11または12記載の剤。

【請求項14】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである請求項11ないし13記載の剤。

【請求項15】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

【請求項16】食後過血糖改善剤である請求項15記載の剤。

【請求項17】糖尿病または高脂血症予防・治療剤である請求項15または16記載の剤。

【請求項18】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項15ないし17記載の剤。

【請求項19】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる食後過血糖の診断薬。

【請求項20】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを含有してなる食後過血糖の診断薬。

【請求項21】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項22】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実

質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項21記載のスクリーニング方法。

【請求項23】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを含有することを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項24】請求項21もしくは22記載のスクリーニング方法または請求項23記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩。

【請求項25】請求項24記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項26】食後過血糖改善剤である請求項25記載の医薬。

【請求項27】糖尿病または高脂血症予防・治療剤である請求項25または26記載の医薬。

【請求項28】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項29】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである請求項28記載のスクリーニング方法。

【請求項30】 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項31】請求項28もしくは29記載のスクリーニング方法または請求項30記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩。

【請求項32】請求項31記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項33】食後過血糖改善剤である請求項32記載の医薬。

【請求項34】糖尿病または高脂血症予防・治療剤である請求項32または33記載の医薬。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

### 【発明の属する技術分野】

本発明は、 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性または該ホモログの遺伝子の発現を調節（阻害または促進）する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み調節（阻害または促進）剤、該ホモログを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩、その化合物または塩を含有する医薬などに関する。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

グルコースが細胞内外を移行するには、細胞膜上に糖輸送担体と呼ばれる膜蛋白質が必要である。

グルコースの輸送担体は、受動輸送担体である促通拡散型グルコーストランスポーター (GLUT) と $\text{Na}^+$ イオン輸送と共に役することでグルコースを濃度勾配に逆らって輸送する能動輸送担体である $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) に大別される。GLUT は、8種類のアイソフォームが存在し、分子量約5万の細胞膜を1回貫通する共通構造を有している。

SGLT は、分子量7.5万の細胞膜を14回貫通する共通構造を有している。

非特許文献1（日本臨床 55, 1997、増刊号、糖尿病I、59-64）にはSGLT1および2の機能や発現部位が概説されている。

ヒトSGLT1 は、小腸、腎臓に特異的に発現しグルコースに対して高親和性で輸送能は小さく、ヒトSGLT2 は、腎臓特異的に発現しグルコースに対して低親和性で輸送能は大きい事が知られている。SGLTは、グルコースの小腸からの吸収と、腎臓から一旦尿中に排出されたグルコースを再吸収する役割を担っている。

また、SGLTホモログは、特許文献1 (WO 02/53738) に開示された蛋白質であり、肝臓で発現しており、これを賦活化することで糖新生を抑制し空腹時高血糖を是正する糖尿病治療薬となると考えられる。

一方、糖尿病における食後高血糖（食後過血糖）は、食事摂取後の血糖値の上昇に対応したインスリン分泌の低下と肝臓・筋肉におけるインスリン抵抗性が

加わって生じる。食後高血糖を是正する手段として $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬がある。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬は、多糖類から単糖への消化を抑制することで、腸管から糖を吸収する速度を遅延する。しかし、食事中のグルコースの吸収は抑制できないため、長期的な血糖値の指標であるHbA1c値の低下効果は低い。また、小腸内に未分解で残るスクロースやマルトースにより、水溶性下痢、腹部膨満感などの副作用を生じることがある。

#### 【0003】

##### 【非特許文献1】

日本臨床 55, 1997、増刊号、糖尿病I、59-64

#### 【0004】

##### 【特許文献1】

WO02/53738

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

小腸で主に糖の吸収の役割を担っていると考えられているSGLT1を阻害すれば、食事中のグルコースの吸収を抑制し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬よりも強力に食後高血糖を是正することが期待できる。また、二糖類に比べて単糖のグルコースは水分貯留が軽度であるため、消化管症状の副作用も軽減できることが期待される。

しかしながら、SGLTの阻害剤であるフロリジンおよびその誘導体は、ラットにおいて、SGLTを阻害することで、腎臓におけるグルコースの再吸収を抑制し、尿中にグルコースを排出することで血糖値を降下させる作用が示されている(Diabetes 48:1794-1800, 1999)が、腸管からの糖の吸収抑制作用は弱いことが報告されている(Journal of Medicinal Chemistry 42: 5311-5324, 1999)。

これは、小腸においてフロリジンに耐性が強い別のSGLTが存在するためと考えられる(Am J Physiol 256 : G618-G623, 1989, Am J Physiol 270 : G833-G843, 1996)が、その実体は現在まで明らかでない。フロリジン耐性のSGLTの実体を明らかにし、SGLT阻害作用を応用した腸管からの糖の吸収抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られる化合物を提

供することが課題である。

従って、小腸でのグルコース取り込みを特異的に調節（阻害または促進）しうる薬剤の開発が待たれているのが現状である。

### 【0006】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すること目的とし、Gene Logic データベースを検索した結果、 $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター蛋白質であるヒトSGLTホモログが、ヒトSGLT1の約二倍、小腸において発現していることを見い出した。かかる知見に基づき、さらに研究を進めた結果、SGLTホモログが、小腸におけるグルコースの吸収に重要な輸送担体であることを突き止め、さらに、これを阻害することは、食後血糖の上昇を抑制する糖尿病治療薬として有効であり、これを促進することは、グルコースの吸収を促進する低血糖治療薬、胃腸薬として有効であると考え、検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

- (1)  $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；
- (2)  $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；
- (3) 食後過血糖改善剤である前記 (1) または (2) 記載の剤；
- (4) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記 (1) ないし (3) 記載の剤；
- (5)  $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤；
- (6)  $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤；
- (7) グルコースの吸収促進剤である前記 (5) または (6) 記載の剤；
- (8)  $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記 (1) ないし (7) 記載

の剤；

(9)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記（1）ないし（7）記載の剤；

(10)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記（1）ないし（7）記載の剤；

(11)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；

(12) 食後過血糖改善剤である前記（11）記載の剤；

(13) 糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である前記（11）または（12）記載の剤；

(14)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである前記（11）ないし（13）記載の剤；

(15)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；

(16) 食後過血糖改善剤である前記（15）記載の剤；

(17) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記（15）または（16）記載の剤；

(18)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記（15）ないし（17）記載の剤；

(19)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる食後過血糖の診断薬；

(20)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを含有してなる食後過血糖の診断薬；

(21)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法；

(22)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3 または配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記（21）記載のスクリーニング方法；

(23)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを含有することを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

(24) 前記（21）もしくは（22）記載のスクリーニング方法または前記（23）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩；

(25) 前記（24）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬；

(26) 食後過血糖改善剤である前記（25）記載の医薬；

(27) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記（25）または（26）記載の医薬；

(28)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法；

(29)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4 または配列番号：6 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである前記（28）記載のスクリーニング方法；

(30)  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込

み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

(31) 前記(28)もしくは(29)記載のスクリーニング方法または前記(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩；

(32) 前記(31)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬；

(33) 食後過血糖改善剤である前記(32)記載の医薬；

(34) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記(32)または(33)記載の医薬；などに関する。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明で用いられる $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログ(以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある)としては、例えば、WO02/53738に開示されたSGLTホモログ、WO01/75067に開示されたSGLTホモログ、WO01/92304に開示されたSGLTホモログ(TRICH)、WO02/4520に開示されたSGLTホモログ(TRICH)、WO02/10216に開示されたSGLTホモログなどが挙げられるが、なかでも、WO02/53738に開示されたSGLTホモログが好ましく、とりわけ、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が好ましく用いられる。

$\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター(SGLT)ホモログは、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視

床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

### 【0008】

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、比較するアミノ酸配列に対して、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。

例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、グルコースの能動輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、グルコースの能動輸送活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

グルコースの能動輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことが出来るが、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the Xenopus laevis intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

### 【0009】

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ま

しくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

#### 【0010】

本発明で用いられるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO-）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1</sub>-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3</sub>-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6</sub>-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1</sub>-2アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1</sub>-2アルキル基などのC<sub>7</sub>-14アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボ

キシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1</sub>—6アルカノイルなどのC<sub>1</sub>—6アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば—OH、—SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1</sub>—6アルカノイル基などのC<sub>1</sub>—6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト由来のタンパク質などがあげられる。

#### 【0011】

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

本発明のタンパク質が構成するアミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1また

は2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば第176番目～201番目、第471番目～491番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：3で表されるアミノ酸配列において例えば第172番目～197番目、第467番目～487番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：5で表されるアミノ酸配列において例えば第175番目～200番目、第470番目～490番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。

### 【0012】

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO-）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列において第261～275番目、第399～417番目、第500～649番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列において第257～271番目、第395～413番目、第496～645番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：5で表されるアミノ酸配列において第260～274番目、第398～416番目、第499～648番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

### 【0013】

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

#### 【0014】

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶

液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N' -ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBr, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBrエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

#### 【0015】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエ斯特ル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

#### 【0016】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシ

カルボニル、イソポルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシリ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C1-6)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、C12-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

### 【0017】

原料のカルボキシリ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBut）とのエステル〕などが用いられる。原料

のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd—黒あるいはPd—炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタансルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

### 【0018】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保

護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

#### 【0019】

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)～(v)に記載された方法が挙げられる。

- (i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- (ii) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- (iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- (iv) 矢島治明 および 柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- (v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩

に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

### 【0020】

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。また、例えば、配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。また、例えば、配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：6で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

### 【0021】

例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

### 【0022】

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

### 【0023】

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラーコローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を

適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。‘

#### 【0024】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

#### 【0025】

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシ

リン耐性遺伝子（以下、*Amp<sup>r</sup>*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neo<sup>r</sup>*と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、*dfr*遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて*dfr*遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*PhoA*・シグナル配列、*OmpA*・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、*MF $\alpha$* ・シグナル配列、*SUC2*・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

#### 【0026】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1

984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC 1913, NCYC 2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

### 【0027】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA c N P Vの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがB m N P Vの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞)などが用いられる。該S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 21 細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスA T T - 20, マウスミエローマ細胞, マウスA T D C 5 細胞, ラットG H 3, ヒトFL細胞などが用いられる。さらに、ヒト癌細胞由来細胞株 (DL D - 1 細胞、H C T - 15 細胞、S W - 480 細胞、L o V o 細胞、H C T - 116 細胞、W i D r 細胞、H T - 29 細胞、L S - 174 T 細胞、S N U - C 1 細胞、S N U - C 4 細胞、S N U - C 2 A 細胞、C X - 1 細胞、G I - 12 細胞、H L - 60 細胞、R a j i 細胞、G 361 細胞、S 3 細胞)なども用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (

Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

### 【0028】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991) 、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267 (1995) (秀潤社発行) 、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

### 【0029】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature) , 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔バイロロジー (Virology) , 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association)

ation) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

#### 【0030】

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸ゲアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

#### 【0031】

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あ

るいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンプロットティングなどにより測定することができる。

### 【0032】

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体產生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体產生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体產生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、

例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンギリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

### 【0033】

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例

えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1～10%の牛胎児血清を含む G I T 培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（S FM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0034】

##### (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることが

できるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

### 【0035】

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も

好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、（口）RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列の一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）などが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'－O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

### 【0036】

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することができるアンチセンス・ポリヌクレオチドを、クローニングした、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハ

ハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有する他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあ

るもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーレーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターラント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内スクレオシド結合を介して付着させることができ。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

### 【0037】

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある））、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNA

のアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

### 【0038】

#### （1）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のタンパク質は、 $\text{Na}^+$ ／グルコーストランスポーターとしてグルコースの能動輸送活性を有し、小腸においては、グルコース取り込みに寄与している。

したがって、本発明のタンパク質の活性や該タンパク質の遺伝子の発現量を、小腸において減少させることにより、食後過血糖の改善などに有効であり、例えば、糖尿病、高脂血症などの疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。また、本発明のタンパク質の活性や該タンパク質の遺伝子の発現量を、小腸において亢進させることにより、グルコースの吸収促進剤など低血糖治療薬、胃腸薬などの医薬として使用することができる。

例えば、小腸において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、グルコースの小腸への取り込みが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

また、例えば、小腸において本発明のタンパク質の発現が亢進しているために、グルコースの小腸への取り込みが亢進され、食後過血糖の症状を呈している患者がいる場合に、（イ）本発明のアンチセンスDNAを該患者に投与することによって、（ロ）本発明の抗体を產生する細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明の抗体を該患者に投与することによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を抑制させることができる。

本発明のDNA（アンチセンスDNAも含む）を上記の予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適

当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたはその他の温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリソのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）が挙げられる。

リコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、グルコースの吸収促進剤の目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、グルコースの吸収促進剤の目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、ヒトSGLTホモログタンパクと表記することがある)はヒトの小腸、脾臓、肝臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、糖尿病における

る早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

小腸においてヒトSGLTホモログタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば小腸へのグルコース取り込みを阻害し、血糖値を減少できるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして有用であり、また、例えば、糖尿病、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。

一方、小腸においてヒトSGLTホモログタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば小腸へのグルコース取り込みを促進できるので、例えば、グルコースの吸収促進剤などとして有用であり、また、例えば、低血糖治療薬、胃腸薬として使用することができる。

#### (2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩は、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして使用することができる。好ましくは食後過血糖改善剤などである。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物、あるいは本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(1)試験化合物存在下と(2)試験化合物非存在下の場合における、本発明のタンパク質の遺伝子発現量を測定して、比較することを特徴とするものである。

上記スクリーニング方法においては、例えば、(1)と(2)の場合における、小腸へのグルコース取り込み作用と本発明のタンパク質の遺伝子発現量を測定して、

比較することを特徴とするものである。

### 【0039】

また、本発明は、

- (1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性(例えば、グルコースの能動輸送活性など)を促進または阻害する化合物またはその塩(以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、  
(2) (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の糖取り込み活性と(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の糖取り込み活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、前記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合において、糖取り込み活性を<sup>3</sup>H標識したグルコースまたは2-deoxy-glucoseなどのグルコース類縁体の細胞内への蓄積を放射活性で測定し、グルコースの能動輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

本発明のスクリーニングにおいては、タンパク質を産生する能力を有する細胞に、グルコースの能動輸送活性阻害剤(例、フロリジン)などをポジティブコントロールとして使用してもよい。

すなわち、本発明は

(i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、<sup>3</sup>H標識したグルコースまたはグルコース類縁体を取り込ませると同時もしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性阻害剤を添加した場合と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、<sup>3</sup>H標識したグルコースまたはグルコース類縁体を取り込ませると同時もしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性賦活化剤または阻害剤、および試験化合物を添加した場合とを比較し、その取り込み量の変化を測定することを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

本発明のタンパク質のグルコースの能動輸送活性は、公知の方法、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the Xenop

us laevis intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、前記(ii)の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、前記(ii)の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質SGLTホモログ遺伝子のプロモータ下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、前記の各種細胞に発現させ、該細胞に前記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質(SGLTホモログ)の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

更に遺伝子産物によって発現が制御されると考えうる遺伝子などのプロモーターを用いたレポーター・ジーン・アッセイにおいてその活性の調節を特徴とするスクリーニング法を提供する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、生体由来非ペプチド性化合物（糖質、脂質など）、合成化合物、微生物培養物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を產生する能力を有する細胞をスクリーニングに適した培地を用いて培養する。培地は、本発明のタンパク質の遺伝子発現に影響を与えないものであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を產生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿

主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

#### 【0040】

本発明のタンパク質の活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の作用を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

#### 【0041】

さらに、本発明のタンパク質をコードする遺伝子も、小腸において発現が多く見られるので、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩も、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤として使用することができる。好ましくは食後過血糖改善剤などである。

したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特

徵とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、(iii)と(iv)の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明の遺伝子発現量は、自体公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)やTaqMan polymerase chain reactionなどの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記(iv)の場合における遺伝子発現量を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害するあるいは増強する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害するあるいは増強する化合物として選択することができる。

#### 【0042】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性あるいは本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用い

られる。

本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従つて製剤化することができる。

#### 【0043】

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従つて、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通

常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

#### 【0044】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を小腸に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### 【0045】

(2a) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある

) は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC末端部に反応する抗体であることが望ましい。

#### 【0046】

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例

えば、[125I]、[131I]、[3H]、[14C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンーアビジン系を用いることもできる。

#### 【0047】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

### 【0048】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレンゲリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

### 【0049】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免

疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

### 【0050】

#### （3）遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874～879頁、1989年、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the National Academy of Sci

ences of the United States of America) , 第86巻, 2766~2770頁、1989年) などにより実施することができる。

### 【0051】

#### (4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を調節することができるアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能を調節（好ましくは抑制）することができるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法にしたがって製剤化し、投与することができる。

例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエイテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段にしたがって、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドはそのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下、関節腔内等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1~100mg投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブと

して使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、本発明のタンパク質が結合するDNA配列に対するデコイオリゴヌクレオチドなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

デコイオリゴヌクレオチドは、公知の方法（例、The Journal of Clinical Investigation, 106巻, 1071頁, 2000年）に準じて、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列を基に設計して製造することができる。具体的には、該デコイオリゴヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質が結合し得るものであれば何れのものでもよい。本発明のタンパク質が結合するDNAの配列とハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

上記の二重鎖RNA、リボザイムまたはデコイオリゴヌクレオチドを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

### 【0052】

#### (5) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば食後過血糖改善剤などの予防・治療剤などの医薬もしくは診断薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、関節内投与）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、食後過血糖改善剤のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、粉末吸入剤により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

### 【0053】

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、関節内投与）に適する剤形として提供される。好ましくは吸入剤として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

### 【0054】

#### (6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF1系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

#### 【0055】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

#### 【0056】

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳がんウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI I、ウロプラキンI I、エラスターーゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋ク

レアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリfosファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

### 【0057】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝

臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0058】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治疗方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などのスクリーニング試験にも利用可能である。好ましくは食後過血糖改善剤などのスクリーニング試験である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

### 【0059】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療

方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、例えば食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤のスクリーニング試験にも利用可能である。好ましくは食後過血糖改善剤のスクリーニング試験である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

#### 【0060】

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク

質產生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができる、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 【0061】

##### (7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進

または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

### 【0062】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

### 【0063】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスクレベラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のインtron部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polYA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とター

ゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはつきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

#### 【0064】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減

できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $n = 40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO纖維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

#### 【0065】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を

用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

### 【0066】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入

したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

### 【0067】

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿など

があげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のD N A発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

#### 【0068】

本発明のスクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えは、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えは、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リノゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えは、ヒトまたは哺乳動物（例えは、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えは、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 k gとして）の食後過血糖患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100 m g、好ましくは約1.0～50 m g、より好ましくは約1.0～20 m g投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えは、該化合物を注射剤の形で通常成人（体

重60kgとして)の食後過血糖患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

### 【0069】

(8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフェオヌクレオターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモークロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質とな

る試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（P B S）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

### 【0070】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の調節、該タンパク質の機能を調節することができるので、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤、好ましくは食後過血糖改善剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の食後過血糖患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の食後過血糖患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

#### 【0071】

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-

I U B Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

D N A	: デオキシリボ核酸
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
R N A	: リボ核酸
m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
A T P	: アデノシン三リン酸
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
G l y	: グリシン
A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸

L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

## 【0072】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l <sub>2</sub> -Bz l	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブトキカルボニル
D N P	: ジニトロフェニル

T r t : トリチル  
B u m : t-ブロキシメチル  
F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
H O O B t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-  
1, 2, 3-ベンゾトリアジン  
H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルポルネン-2, 3-ジカルボキシミド  
D C C : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

### 【0073】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

#### 〔配列番号：1〕

ヒトSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

#### 〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

#### 〔配列番号：3〕

マウスSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

#### 〔配列番号：4〕

配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するマウスSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

#### 〔配列番号：5〕

ラットSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

#### 〔配列番号：6〕

配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するラットSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

#### 〔配列番号：7〕

実施例2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

#### 〔配列番号：8〕

実施例2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

実施例2（1）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

実施例2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

実施例2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

実施例2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

実施例2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例2（2）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

実施例2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

実施例2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

実施例4で用いられたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

実施例5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例5（1）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：24]

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：25]

実施例 5 (2) で用いられたプローブの塩基配列を示す。

[配列番号：26]

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：27]

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：28]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：29]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：30]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：31]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：32]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：36]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【0074】

【発明の実施の形態】

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0075】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

## 【0076】

## 実施例1 フロリジンによる糖取りこみ抑制作用の測定

WO02/53738の実施例4に記載の方法に従って、ヒトSGLTホモログ(hSGLTh)、マウスSGLTホモログ(mSGLTh)、ラットSGLTホモログ(rSGLTh)、ヒトSGLT1(hSGLT1)、ヒトSGLT2(hSGLT2)発現CHO細胞株を作製し、実験に用いた。SGLTによって選択的に細胞内に取りこまれるグルコースアナログである $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270 : G833-G843, 1996およびJ. Clin. Invest 93 : 397-404, 1994の方法に従って行った。細胞を96wellプレートに $1\times10^5$ 細胞 / well、 $100\mu l$  10% FBS 添加DMEM培地で播種し、37°C、一夜培養した。細胞をバッファー(125 mM N-Methyl-D-Glucamine, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.1 mg/ml BSA) 150  $\mu l$ で3回洗浄後同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよびN-Methyl-D-Glucamine(NMDG)をNaClあるいはNaCl + Phlorizin(Sigma社)に置き換えたバッファー 90  $\mu l$ を添加した。 $1\text{mM}$   $\alpha$ -Methyl Glucoseを各wellに $10\mu l$ ( [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Methyl Glucose(アマシャム ファルマシアバイオテク社) 0.02  $\mu \text{Ci}$ を含む) 添加し1時間後、冷PBSバッファー 200  $\mu l$ で3回洗浄した。各wellに液体シンチレータ100  $\mu l$ を添加し、細胞に取り込まれた $^{14}\text{C}$ のカウントを測定した。

結果を表1および表2に示した。

〔表1〕 hSGLT1, hSGLT2, hSGLThのフロリジン耐性度の比較

$\alpha$ -Methyl Glucoseの取込量

(control群に対する%表示)

	hSGLT1	hSGLT2	hSGLTh
--	--------	--------	--------

control群(NMDG添加・NaCl非添加群)	100± 18	100±15	100± 12
NaCl添加群	1039±186	830±99	767± 85
NaCl+フロリジン 3 $\mu$ M添加群	244± 48	139±23	570±142
NaCl+フロリジン 100 $\mu$ M添加群	60± 14	48± 8	124± 19

〔表2〕 mSGLTh, rSGLThのフロリジン耐性度の比較

$\alpha$ -Methyl Glucoseの取込量 (control 群に対する%表示)		
	mSGLTh	rSGLTh
control群(NMDG添加・NaCl非添加群)	100± 6	100± 1
NaCl添加群	819±54	953± 0
NaCl+フロリジン 15 $\mu$ M添加群	521±35	643±76
NaCl+フロリジン 500 $\mu$ M添加群	78± 8	118± 6

表1および表2から明らかなように、ヒト、マウス、ラットSGLT ホモログは、hSGLT1, hSGLT2 と同様に、Na<sup>+</sup>濃度に依存して  $\alpha$ -Methyl Glucose を取り込んだが、Phlorizin への耐性がSGLT1、SGLT2よりも強いことが証明された。

## 【0077】

## 実施例2 ヒト消化管におけるSGLTホモログの発現分布の解析

## (1) TaqMan PCR によるヒトSGLTホモログの発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムジャパン)を用いて検索し、プライマー cccgatgcttccacat gcttc (配列番号：7) 、プライマー acaatgacctggctgtgcacc (配列番号：8) 、プローブ acatccctggccaggctcatttcgg (配列番号：9) を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダードDNA として、ヒトSGLTホモログのPCR断片を使用した。PCR反応における反応液の組成はヒトSGLTホモログDNA 1 $\mu$ lを鑄型として使用し、Pfu Turb

o DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1 $\mu$ l量、プライマー gggggccagaggatccaggta (配列番号：10) およびプライマー gcaatcatcagccccgcagac (配列番号：11) を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の後、96°C・20秒、60°C・30秒、72°C・1分のサイクルを35回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。このPCR反応産物を1% アガロースゲル電気泳動し、0.7 Kbp DNA断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出した。該 PCR断片を10<sup>0</sup>- 10<sup>6</sup> コピー/ $\mu$ l に調製してスタンダードDNA として使用した。

### 【0078】

#### (2) TaqMan PCR によるヒトSGLT1の発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムズジャパン)を用いて検索し、プライマー agcaccctttcaccat gga (配列番号：12) 、プライマー aaacaaccccccggcaatcat (配列番号：13) 、プローブ ccaaggtccgcaagagagcatctga (配列番号：14) を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダードDNA として、ヒトSGLT1のPCR断片を使用した。PCR反応における反応液の組成はヒトSGLT1 DNA 1 $\mu$ lを錆型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1 $\mu$ l量、プライマー tgtgtcgcccttcagaatgtg (配列番号：15) およびプライマー agaacttagttcaggcaaaatatgcatt (配列番号：16) を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の後、96°C・20秒、60°C・30秒、72°C・1分のサイクルを35回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。このPCR反応産物を1% アガロースゲル電気泳動し、1.0 Kbp DNA断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出した。該 PCR断片を10<sup>0</sup>- 10<sup>6</sup> コピー/ $\mu$ l に調製してスタンダードDNA として使用した。

各組織のcDNA ソースとして、ヒト消化管MTCパネル (クロントック社) を使用した。上記プライマー (配列番号：7) 200nM, 上記プライマー (配列番号：8) 100nM, 上記プローブ (配列番号：9) 50nM, 錆型DNA に、TaqMan Universal PCR Master Mix (PE バイオシステムズジャパン)を添付書類記載の規定量加え、

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズジャパン)で PCR反応および解析を行った。

ヒト消化管MTCパネル（クロンテック社）を用いて、TaqMan PCR 法でヒトSGLT ホモログの発現分布を調べたところ、図1に示すとおり、食物由来のグルコース の主な吸収部位である空腸で最も高い発現が認められた。多糖類は十二指腸において胰アミラーゼによる分解を受け、空腸で主に吸収されるものと考えられる。

### 【0079】

実施例3 初代培養正常ヒト小腸上皮細胞におけるSGLT1, SGLTホモログの発現 解析

正常ヒト小腸上皮細胞 (Cell System-IE Cells) は、大日本製薬から購入した。コラーゲンコートプレート (24穴プレート) にCS-2.0培地 (25mM グルコース 、10%FBSおよび抗生物質添加) で $2 \times 10^5$ cells/well播種し、2日置きに培地交換し 13日間培養した。RNAeasy mini キット (Qiagen) を用いて、トータルRNA を抽出し、TaqMan Gold RT-PCR キット (PE biosystems) を用い、TaqMan PCR 法でヒ トSGLT (hSGLT) ホモログ、hSGLT1の発現量を測定した。図2に示すとおり、正 常ヒト小腸上皮細胞 (Cell System-IE Cells) において、hSGLTホモログ (hSGLT h) は、hSGLT1と同等以上に発現していた。

### 【0080】

実施例4 抗ヒトSGLTホモログ抗体によるヒト小腸切片の免疫染色

#### (1) 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体の作製

ヒトSGLTホモログの261-275番目のペプチドの275番目のアミノ酸残基にシステ インをつけたもの (クラボウ社) を免疫原ペプチド [H-HisAsnLeuArgAspProValSerGlyAspIleProTrpGlyCys (配列番号：17) -NH<sub>2</sub>= H-HNLRDPVSGDIPWGC-NH<sub>2</sub>] として使用した。N-( $\gamma$ -マレイミドブチリロキシ)サクシニミド(GMBS) とKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を混合し、室温で40分反応した。セファデックスG- 25カラムで分画し、マレイミド基の導入されたKLHを得た。免疫原ペプチド5mgと マレイミド基の導入されたKLHを等量混合し4°Cで1日間反応した。PBS buffer で 2日間透析し、PBS bufferに1mg/mlの濃度で懸濁した。

完全フロイントアジュvantと抗原を等量で混合し (トータル0.6 ml) 、3ヶ

月齢のNew Zealand white rabbit に皮下免疫した。以後、2～3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュvantとともに3回追加免疫した。

5mg の合成ペプチドとSulfo-Link gel 5ml をシステインを介して結合させ、PBS bufferで平衡化した。5mlの抗血清をペプチドを結合したゲルに通し、PBS buffer (5 ml) で3回洗浄した。ペプチドに結合した抗体を0.1N グリシン-HCl buffer (pH 2.5) 8 ml で溶出した。2.4 ml のTris buffer で中和し、抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体とした。

この抗体を用いて、ヒト小腸切片の免疫染色を行なったところ、Villiの基底部から先端まで糖吸収部位である上皮細胞 (SGLT1もここで発現している (Eur.J.Physiol 430:151, 1995) )において、タンパクレベルで発現が確認された。結果を図3に示す。

### 【0081】

#### 実施例5 糖尿病動物におけるSGLTホモログの発現変動

糖尿病患者では、小腸からの糖吸収の亢進が認められている (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282:G241-G248 2002)。糖尿病モデルマウスであるKKAY と正常マウスのC57/BL6および糖尿病モデルラットであるWistar fatty と正常ラットのWistar lean の小腸におけるSGLTホモログの発現量をTaqMan PCR法で比較した。

##### (1) TaqMan PCRによるマウスSGLTホモログの発現量の解析

TaqMan PCRに用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver.1.0 (PE バイオシステムズジャパン)を用いて検索し、

プライマー (5' -tgcacagaccaggatgttg-3') [配列番号：18]

プライマー (5' -gcacggaggccctccctg-3') [配列番号：19]

プローブ (5' -ctcgcagccaacaatcttcacatg-3') [配列番号：20]

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM(6-carboxyfluorescein)を付加した。

スタンダードDNAとしてマウスSGLTホモログのPCR断片を使用した。PCR反応における反応液の組成はマウスSGLTホモログ DNA 1μlを錆型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE社) 1μl量、プライマー (5' -atctctaattgtccag

caatgtg-3' ) [配列番号： 21] およびプライマー (5' -accagcttgggttaggcaat-3' ) [配列番号： 22] を各0.5 $\mu$ M、 dNTPsを200 $\mu$ M、 および酵素に添付のバッファーを5 $\mu$ l加え、 50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、 94°C・1分の後、 96°C・2秒、 62°C・30秒、 72°C・30秒のサイクルを40回繰り返し、 最後に72°C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲル電気泳動し、 0.9 kbp DNA断片を切り出し、 ゲルエクストラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出した。該PCR断片を10<sup>0</sup> - 10<sup>6</sup>コピー/ $\mu$ lに調整してスタンダードDNAとして使用した。

糖尿病モデルマウスであるKKAY と正常マウスのC57/BL6マウスより十二指腸および空回腸を摘出、 ここからtotal RNAを抽出した。total RNAの抽出はISOGEN(ニッポンジーン社)の方法に従った。得られたRNA 0.1 $\mu$ gを鑄型としてTaqMan Reverse Transcription Reagents(Roche社)の方法に従い、 cDNAを合成した。このcDNA1 $\mu$ lを鑄型とし、 プライマー (5' -tgcacagaccagggtatttg-3' ) [配列番号： 18] 200nM、 プライマー (5' -gcacggagcctccctg-3' ) [配列番号： 19] 200nM、 プローブ (5' -ctcgccaaatatcttcacatg-3' ) [配列番号： 20] 50nM、 にTaqMan universal PCR Master mix(PEバイオシステムズジャパン)を添付書類記載の規定量加え、 ABI PRISM 7700 sequence Detection system(PEバイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析を行った。

### 【0082】

#### (2) TaqMan PCRによるラットSGLTホモログの発現量の解析

TaqMan PCRに用いるプライマーおよびプローブは、 Primer Express ver.1.0(PEバイオシステムズジャパン)を用いて検索し、

プライマー (5' -ctcacagtcttggccacctg-3' ) [配列番号： 23]

プライマー (5' -agaaccggctctctggag-3' ) [配列番号： 24]

プローブ (5' -tgcacggaccagggtattgtgc-3' ) [配列番号： 25]

を選択した。プローブのリポーター色素として、 FAM(6-carboxyfluorescein)を付加した。

スタンダードDNAとしてラットSGLTホモログのPCR断片を使用した。PCR反応における反応液の組成はラットSGLTホモログ DNA 1 $\mu$ lを鑄型として使用し、 Pfu T

urbo DNA polymerase(STRATAGENE社)1 $\mu$ l量、プライマー（5' -tctggagtcagcctg cacacct-3'）〔配列番号：26〕およびプライマー（5' -cagccttctcagctggct cag-3'）〔配列番号：27〕を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・1分の後、96℃・20秒、62℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲル電気泳動し、0.9kbp DNA断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット(Qiagen社)を用いてDNAを抽出した。該PCR断片を100 - 10<sup>6</sup>コピー/ $\mu$ lに調整してスタンダードDNAとして使用した。

糖尿病モデルラットであるWistar fattyと正常ラットのWistar leanの小腸を上部、中部、下部に分け、ここからtotal RNAを抽出した。total RNAの抽出はISogen(ニッポンジーン社)の方法に従った。このRNA 0.1 $\mu$ gを鑄型としてTaqMan Reverse Transcription Reagents(Roche社)の方法に従い、cDNAを合成した。このcDNA 1 $\mu$ lを鑄型とし、プライマー200nM（5' -ctcacagtctggccacctg-3'）〔配列番号：23〕、プライマー 200nM（5' -agaaccggctctctggag-3'）〔配列番号：24〕、プローブ 50nM（5' -tgcacggaccaggattgtgc-3'）〔配列番号：25〕に、TaqMan universal PCR Master mix(PEバイオシステムズジャパン)を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system(PEバイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析を行った。

結果を図4および図5に示す。糖尿病モデル動物であるKKAYマウスとWistar fatty ラットの小腸では、それぞれ対照の正常動物に比べて、SGLTホモログの発現亢進が認められ、糖尿病における小腸での糖吸収の亢進、食後過血糖の原因となっていることが示唆された。

### 【0083】

実施例6 ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル小腸におけるSGLTホモログの発現

ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル小腸におけるSGLT1, SGLTホモログの発現量をRT-PCR法で比較した。

#### RT-PCRによる小腸におけるSGLTホモログの発現解析

ヒトSGLTホモログについては、ヒト空腸cDNA（DCA社）を鋳型とし、プライマー1 gggggccagaggatccaggtgta〔配列番号：28〕、およびプライマー2 aaaatagcccgaggaagatgttga〔配列番号：29〕を用いてPCR反応を行った。この反応における反応液の組成は上記cDNA 1μlを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1μl量、プライマー1およびプライマー2を各0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを5μl加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94℃・1分の後、96℃・20秒、62℃・30秒、72℃・1.5分のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃・7分の伸長反応を行った。同様にヒトSGLT1(NM\_000343)についてはプライマー3 atcctgactgggttgcttt〔配列番号：30〕およびプライマー4 atgctgatgccaatcagcac〔配列番号：31〕を用いてPCRを行い、反応条件は96℃・20秒、55℃・30秒、72℃・30秒を40回繰り返し、他の条件はヒトSGLTホモログの条件と同様とした。

ヒトactinについてはプライマー5 agagctacgagctgcctgac〔配列番号：32〕およびプライマー6 acatctgctggaagggtggac〔配列番号：33〕を用いてPCRを行い、反応条件は96℃・20秒、64℃・30秒、72℃・30秒を40回繰り返し、他の条件はヒトSGLTホモログの条件と同様とした。

#### 【0084】

以下にハムスターSGLTホモログ、SGLT1、サルSGLTホモログ、SGLT1、マウスSGLTホモログ、SGLT1、およびラットSGLTホモログ、SGLT1のRT-PCR反応条件について記す。

ハムスターSGLTホモログおよびSGLT1は9週齢、雄性シリアンハムスター小腸より抽出したRNAを鋳型としてTaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems社) を用いてランダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として以下に記すPCRプライマーと反応条件でPCR反応を行った。

ハムスターSGLTホモログ

forward: tgccacagtacttgaagaaacgat〔配列番号：34〕

reverse: tgaagaacattggaggatt〔配列番号：35〕

95℃ 20秒、50℃ 30秒、72℃ 30秒 を40回繰り返し

ハムスターSGLT1

forward:caatgaagttaggagggtatgagg [配列番号：36]

reverse:tggcgctgttgaagatggaggtc [配列番号：37]

95℃ 20秒、56℃ 30秒、72℃ 1分 を40回繰り返し

サルSGLTホモログおよびSGLT1はカニクイザル小腸より抽出したRNAを鑄型としてTaqMan reverse transcription reagents を用いてランダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鑄型として以下に記すPCRプライマーと反応条件でPCR反応を行った。

サルSGLTホモログ

forward:atctctaattgtccagcaatgtg [配列番号：38]

reverse:gcaatcatcagccccgcagac [配列番号：39]

95℃ 20秒、57℃ 30秒、72℃ 1分 を40回繰り返し

サルSGLT1

forward:atcctgactgggttgcttt [配列番号：40]

reverse:atgctgatgccaatcagcac [配列番号：41]

95℃ 20秒、55℃ 30秒、72℃ 1分 を40回繰り返し

マウスSGLTホモログおよびSGLT1は8週齢 雄性KKAYマウス小腸より抽出したRNAを鑄型としてTaqMan reverse transcription reagents を用いてランダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鑄型として以下に記すPCRプライマーと反応条件でPCR反応を行った。

マウスSGLTホモログ

forward:ggcaatggaaccaggagtgtc [配列番号：42]

reverse:tcacgcaaaatagccccagagaaag [配列番号：43]

95℃ 20秒、60℃ 30秒、72℃ 2.5分 を40回繰り返し

マウスSGLT1(NM\_019810)

forward:atggacagttagcaccttggcc [配列番号：44]

reverse:tcaggcaaaataggcatggcag [配列番号：45]

95℃ 20秒、55℃ 30秒、72℃ 2.5分 を40回繰り返し

ラットSGLTホモログおよびSGLT1は22週齢 雄性Wistar fatty ラット小腸より抽出したRNAを鑄型としてTaqMan reverse transcription reagents を用いてラ

ンダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として以下に記すPCRプライマーと反応条件でPCR反応を行った。

#### ラットSGLTホモログ

forward: caatggAACCTggagcttcaag [配列番号：46]

reverse: tcacgcaaaatagccccagagaag [配列番号：47]

95°C 20秒、60°C 30秒、72°C 2.5分 を40回繰り返し

ラットSGLT1(NM\_013033)

forward: atggacagttagcaccttgagcc [配列番号：48]

reverse: tcaggcaaaataggcgtggcag [配列番号：49]

95°C 20秒、55°C 30秒、72°C 2.5分 を40回繰り返し

#### 【0085】

図6に示す結果のとおり、マウス、ラットでは、SGLTホモログに比べてSGLT1の発現が高いが、サルではヒトと同様にSGLT1、SGLTホモログの発現が同等で、ハムスターではSGLT1以上にSGLTホモログの発現が認められた。

#### 【0086】

実施例7 マウス、ラット、ハムスター小腸器官培養系による糖取り込み量の測定

小腸器官培養系による糖取り込み量の測定は、Peptides, 19 : 1249-1253 1998およびJ. Agric. Food Chem. 48 : 5618-5623 2000の方法に従った。マウス、ラット、モルモット、ハムスターは、エーテル麻酔後頸動脈を切断して安楽死させた。空腸領域を切り出し、腸間膜脂肪を取り除き、管を切り開いて内容物を洗浄し、1cm長に切り分けた。空腸切片をバッファー (125 mM N-Methyl-D-Glucamine (NMDG), 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH 7.2), 0.1mg/ml BSA) で3回洗浄後、48-wellプレートに1個ずつ移した。同バッファーおよびNMDGをNaClあるいはNaCl + Phlorizin 30 μM) に置き換えたバッファー 270 μl を添加した。10mM α-Methyl Glucose, 10mM D-mannitol を各well に30 μl ([<sup>14</sup>C] α-Methyl Glucose (AMG) (アマシャム ファルマシア バイオテク社) 0.12 μCi, [<sup>3</sup>H]D-mannitol (Perkin Elmer LifeSciences) 0.3 μCi を含む) を添加し、37°C、10分間培養後、冷PBS バッファー 30

0ulで3回洗浄した。空腸切片を液体シンチレーション測定用ミニバイアルに移し、組織溶解剤 Solvable (Perkin Elmer LifeSciences) 500  $\mu$ lを添加し、50°Cで2時間処理して溶解した。液体シンチレータUltima Gold-XR (Perkin Elmer LifeSciences) 5ml を添加し、空腸切片に取り込まれた<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>Hのカウントを測定した。図7に示す結果のとおり、ハムスターの小腸では、フロリジンに耐性の強いSGLT活性が認められ、SGLTホモログの糖取り込み活性が確認された。

### 【0087】

#### 【発明の効果】

本発明で用いられるタンパク質の活性や遺伝子発現を調節する化合物またはその塩、該タンパク質の活性を調節する中和抗体は、例えば食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして使用することができる。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明で用いられるタンパク質の発現を調節することができ、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

### 【0088】

#### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Use of SGLT homolog

<130> B03126

<150> JP 2002-314041

<151> 2002-10-29

<160> 49

<210> 1

<211> 674

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser  
 20 25 30  
 Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser  
 35 40 45  
 Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly  
 85 90 95  
 Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu  
 100 105 110  
 Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val  
 115 120 125  
 Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln  
 130 135 140  
 Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly  
 165 170 175  
 Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val  
 180 185 190  
 Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu  
 195 200 205  
 Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly  
 210 215 220  
 Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245 250 255  
Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro  
260 265 270  
Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp  
275 280 285  
Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu  
290 295 300  
Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu  
305 310 315 320  
Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe  
325 330 335  
Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys  
340 345 350  
Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met  
355 360 365  
Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met  
370 375 380  
Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr  
385 390 395 400  
Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu  
405 410 415  
Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Val Phe Leu Val Val  
420 425 430  
Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln  
435 440 445  
Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile  
450 455 460  
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro  
465 470 475 480

Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg  
 485 490 495  
 Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp  
 500 505 510  
 Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile  
 515 520 525  
 Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys  
 530 535 540  
 Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr  
 545 550 555 560  
 Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr  
 565 570 575  
 Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly  
 580 585 590  
 Ala Ala Glu Asn Ser Ser Leu Gly Gln Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser  
 595 600 605  
 Arg Ser Trp Gly Lys Leu Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly  
 610 615 620  
 Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Ala Leu Glu Gln  
 625 630 635 640  
 Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn  
 645 650 655  
 Ile Asn Ala Val Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr  
 660 665 670  
 Phe Ala  
 674  
 <210> 2  
 <211> 2022  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atgggcctg gagcttcagg ggacgggtc aggactgaga cagctccaca catagcactg	60
gactccagag ttggctcgca cgcc tacgac atcagcgtgg tggcatcta cttgtcttc	120
gtcattgctg tgggatctg gtcgtccatc cgtcaagtc gagggaccat tggcgctat	180
ttcctggccg ggaggtccat gagctggtg ccaattggag catctctgat gtccagcaat	240
gtggcagtg gcttgcata cgccctggct gggacagggg ctgccggagg cttgccgta	300
ggtggttcg agtggAACgc aacctggctg ctccctggcc ttggctgggt cttcgccct	360
gtgtacatcg cagcagggtgt ggtcacaatg ccgcagtatc tgaagaagcg atttggggc	420
cagaggatcc aggtgtacat gtctgtcccg tctctcatcc tctacatctt caccaagatc	480
tcgactgaca tcttctctgg agccctcttc atccagatgg cattggctg gaacctgtac	540
ctctccacag ggatcctgct ggtgggtact gccgtctaca ccattgcagg tggcctcatg	600
gccgtgatct acacagatgc tctgcagacg gtgatcatgg tagggggagc cctggtcctc	660
atgtttctgg gcttcagga cgtggctgg tacccaggcc tggagcagcg gtacaggcag	720
gccatcccta atgtcacagt ccccaacacc acctgtcacc tcccacggcc cgatgcttc	780
cacatgcttc gggaccctgt gagcggggac atcccttggc caggtctcat ttcgggctc	840
acagtgctgg ccacctggtg ttggcaca gaccaggta ttgtgcagcg gtctctctg	900
gccaagagtc tgtctcatgc caagggaggc tccgtctgg gggctaccc gaagatcctc	960
cccatgttct tcacgtcat gcctggcatg atcagccggg ccctgttccc agacgaggtg	1020
ggctgcgtgg accctgatgt ctgccaaga atctgtgggg cccgagtggg atgttccaac	1080
attgcctacc ctaagtttgtt catggccctc atgcctgttg gtctgcgggg gctgatgatt	1140
gccgtgatca tggccgtct catgagctca ctacaccca tcttcaacag cagcagcacc	1200
ctgttacca ttgatgtgtg gcagcgttc cgcaggaaatg caacagagca ggagctgatg	1260
gtggtggca gagtgttgtt ggtgtccctg gttgtcatca gcatcctctg gatccccatc	1320
atccaaagct ccaacagtgg gcagctttc gactacatcc aggctgtcac cagttacctg	1380
gccccaccca tcaccgtct cttcctgtg gccatcttct gcaagagggt cacagagccc	1440
ggagctttct gggcctgt gttggcctg ggagtggggc ttctgcgtat gatcctggag	1500
ttctcataacc cagcgccagc ctgtggggag gtggaccgga ggccagcagt gctgaaggac	1560
ttccactacc tgtactttgc aatcctcctc tgccggctca ctgccccatc cattgtcatt	1620

gtcagcctct gtacaactcc catccctgag gaacagctca cacgcctcac atggtgact 1680  
 cggaactgcc ccctctctga gctggagaag gaggcccacg agagcacacc ggagatatcc 1740  
 gagaggccag ccggggagtg ccctgcagga ggtggagcgg cagagaactc gagcctggc 1800  
 caggagcagc ctgaagcccc aagcaggtcc tggggaaagt tgctctggag ctggttctgt 1860  
 gggctctctg gaacaccgga gcaggccctg agcccagcag agaaggctgc gctagaacag 1920  
 aagctgacaa gcattgagga ggagccactc tggagacatg tctgcaacat caatgctgtc 1980  
 ctttgctgg ccatcaacat cttcctctgg ggctattttgcg 2022

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 678

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 3

Met	Glu	Pro	Gly	Val	Ser	Arg	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Glu	Thr	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

5						10					15			
---	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--

Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	His	Thr	Tyr	Asp	Ile	Val	Val	Val	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20					25					30				
----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--	--

Tyr	Phe	Val	Phe	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Ile	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35					40					45					
----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--

Ser	Arg	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Gly	Arg	Ser	Met	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50					55					60					
----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--

Trp	Trp	Pro	Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Met	Ser	Ser	Asn	Val	Gly	Ser	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65				70				75			80				
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	----	--	--	--	--

Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

85						90					95				
----	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--	--

Gly	Gly	Phe	Glu	Trp	Asn	Ala	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Trp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

100					105				110						
-----	--	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--

Ile	Phe	Val	Pro	Val	Tyr	Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Val	Thr	Met	Pro	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

115					120				125						
-----	--	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--

Tyr	Leu	Lys	Lys	Arg	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Ile	Gln	Val	Tyr	Met	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

130	135	140
Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser Thr Asp Ile		
145	150	155
Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp Asn Leu Tyr		
165	170	175
Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr Thr Ile Ala		
180	185	190
Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln Thr Val Ile		
195	200	205
Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe Gln Glu Val		
210	215	220
Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ala Ile Pro Asn		
225	230	235
Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Pro Asp Ala Phe		
245	250	255
His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Leu		
260	265	270
Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys Thr Asp Gln		
275	280	285
Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser His Ala Lys		
290	295	300
Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro Met Phe Phe		
305	310	315
Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro Asp Glu Val		
325	330	335
Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly Ala Arg Val		
340	345	350
Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala Leu Met Pro		
355	360	365

Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala Ala Leu Met  
 370 375 380  
 Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu Phe Ala Ile  
 385 390 395 400  
 Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln Glu Leu Met  
 405 410 415  
 Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Val Ile Ser Ile Leu  
 420 425 430  
 Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu Phe Asp Tyr  
 435 440 445  
 Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr Ala Leu Phe  
 450 455 460  
 Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Asn Glu Pro Gly Ala Phe Trp  
 465 470 475 480  
 Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met Ile Leu Glu  
 485 490 495  
 Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Met Asp Arg Arg Pro Ala  
 500 505 510  
 Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu Cys Gly  
 515 520 525  
 Leu Thr Ala Ile Ile Ile Val Val Ile Ser Phe Phe Thr Glu Pro Ile  
 530 535 540  
 Pro Asp Asp Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr Arg Asn Cys Ala  
 545 550 555 560  
 Val Ser Asp Leu Gln Lys Lys Thr Ser Val Ser Val Asn Asn Thr Glu  
 565 570 575  
 Asp Asp Asn Ser Pro Gly Leu Ala Gly Arg Pro Val Val Glu Gly Pro  
 580 585 590  
 Ala Gly Asp Glu Glu Glu Ala Asn Thr Thr Gln Gly Pro Glu Gln Pro

595	600	605
Gly Ala Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn Trp Phe Cys		
610	615	620
Gly Leu Ser Gly Ala Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala		
625	630	635
Val Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg		
645	650	655
Arg Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe		
660	665	670
Leu Trp Gly Tyr Phe Ala .		
675	678	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2034

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 4

atggaaccag gagtgtcaag gaatggagtc agaactgaga caacaacgaa cccaaggcctg	60
gggctacata cctatgacat cgtgggtgtg gtcatttatt ttgtctttgt tcttgctgtg	120
ggaatttgggt catccatccg tgcaagtgcg gggaccgttg gtggctattt cctggctggg	180
agatccatga cctggtgccc aattggagca tctctaattt ccagcaatgt gggcagtggc	240
ttatattatcg gcctggctgg aacaggggct gctggaggac ttgctgttgg tggcttttag	300
tggAACGCAA CCTTCCTGCT TCTAGCCCTG GGCTGGATCT TTGTCCCTGT GTACATAGCA	360
GCTGGTGTGG TCACCATGCC ACAGTACCTG AAGAAACGAT TTGGGGACA GAGGATCCAG	420
GTGTACATGT CAGTTCTTC TCTCATCCTC TACATTTCA CCAAGATATC GACTGATATC	480
TTCTCTGGAG CCCTCTTCAT CCAGATGCC TTGGGCTGGA ATCTCTATCT CTCCACAGTC	540
ATCTTGCTGG TGGTGACAGC TGTCTACACC ATTGCAGGGG GCCTCACAGC TGTGATCTAC	600
ACAGATGCTC TACAGACTGT GATCATGGTT GGGGGAGCTC TGGTCCTCAT GTTCTGGGC	660
TTTCAGGAGG TTGGCTGGTA CCCAGGCCCTG CAGCAGCTCT ATAGACAGGC CATCCCCAAT	720
ACCACAGTTG CCAATAACAC CTGTCACCTC CCACGGCCTG ATGCCTTCCA CATGCTTCGA	780

gatcctgtga atggagacat cccctggcca ggtctcattt ttggcctcac agtcttgccc 840  
 acctggtgtt ggtgcacaga ccaggtgatt gtgcagaggt ctctcgac caagaatctt 900  
 tcacatgccca agggaggctc cgtgcttaggg ggctaccta agatcctccc aatgttcttc 960  
 attgtcatgc ctggcatgat cagcagggcc ctgtacccag atgaagttgc ctgtgtggac 1020  
 cctgacatct gtcaaagagt gtgtggggcc agagttggat gctccaatat tgcctacccc 1080  
 aagctggta tggctctcat gcctgtgggg ctgcgaggcc tcatgtattgc tgtgatcatg 1140  
 gctgccctca tgagctcaact cacctctatc ttcaacagca gtagcaccct gtttgccata 1200  
 gatgtgtggc agcgcttccg caggcaggca tcggagcaag agctgatggt ggtaggcagg 1260  
 ttgttcgttag tcttcctgggt agtcatcagc atcctctgga tccccatcat ccagagctcc 1320  
 aatagtgggc agctcttga ctacatccaa tctatcacca gctacttagc cccacccatc 1380  
 acagccctct tcctgctggc tatcttctgc aagagggtca acgagcctgg tgcctctgg 1440  
 ggccctcatgt ttggcctgggt cgtcggaaa ctgcgtatga ttctggagtt ctcatactcg 1500  
 gccccagcct gtggggagat ggacaggcgg ccagctgttc tgaaggactt ccactacctg 1560  
 tactttgccc ttctcctctg tggactgacc gcgatcatca ttgtcgtaat cagcttcttc 1620  
 acggagccca tccccatgca caagcttgcg cgcctgaccc ggtggacaag gaactgtgcc 1680  
 gtatctgacc tgcagaagaa aacctctgtg agtgtgaaca acacagagga tgacaactct 1740  
 ccaggactgg cagggaggcc agtggtagag ggcctgcag gagatgagga agaagcaaac 1800  
 accactcagg ggcctgaaca accaggagcc ctacacaggt cctggggaaa atggctgtgg 1860  
 aactggttct gcggactctc aggagccca cagcaagccc tgagcccagc tgagaaggct 1920  
 gtgttggagc agaagctgac cagcatcgag gaggagccgc tctggagacg tgtctgcaac 1980  
 atcaacgcca tcattcctgct agccatcaac atcttctct gggctattt tgcg 2034

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 5

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

5

10

15

Gln Ala Leu Gly Ser Gly Val Ser Leu His Thr Tyr Asp Ile Val Val

20	25	30
Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser		
35	40	45
Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg		
50	55	60
Ser Met Thr Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val		
65	70	75
Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly		
85	90	95
Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala		
100	105	110
Leu Gly Trp Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr		
115	120	125
Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val		
130	135	140
Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser		
145	150	155
Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp		
165	170	175
Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr		
180	185	190
Thr Ile Ala Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln		
195	200	205
Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe		
210	215	220
Arg Glu Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ser		
225	230	235
Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Ser		
245	250	255

Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp  
 260 265 270  
 Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys  
 275 280 285  
 Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu Ser  
 290 295 300  
 His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro  
 305 310 315 320  
 Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro  
 325 330 335  
 Asp Glu Val Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly  
 340 345 350  
 Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala  
 355 360 365  
 Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala  
 370 375 380  
 Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Ala Ile Asp Val Trp Gln Arg Val Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln  
 405 410 415  
 Glu Leu Met Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Leu Ile  
 420 425 430  
 Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu  
 435 440 445  
 Phe Asp Tyr Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr  
 450 455 460  
 Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Trp Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met

485	490	495
Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Lys Asp Arg		
500	505	510
Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu		
515	520	525
Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Ile Val Ile Ile Ser Phe Phe Thr		
530	535	540
Glu Pro Ile Pro Asp Glu Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr Arg		
545	550	555
Ser Cys Pro Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Val Ser Val Ser Val Asn		
565	570	575
Asn Thr Glu Ser Asp Asn Ser Pro Ala Leu Ala Gly Arg Pro Val Met		
580	585	590
Glu Gly Thr Ala Gly Asp Glu Glu Glu Ala Asn Thr Thr Ser Glu Pro		
595	600	605
Glu Gln Pro Glu Val Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn		
610	615	620
Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly Thr Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala		
625	630	635
Glu Lys Ala Glu Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Pro		
645	650	655
Leu Trp Arg Cys Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile		
660	665	670
Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr Phe Ala		
675	680 681	

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 2043

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 6

atggaacctg gagcttcaag ggatggactc agagctgaga caacacacca agccctggc	60
tctggagtca gcctgcacac ctatgacatc gtggtgtgg tcatctactt tgtctttgtc	120
cttgctgtgg gaatttggtc gtccatccgc gcaagccgag ggaccattgg tggctatttc	180
ctggctggaa gatccatgac ctggtggcca attggagcat ctctaattgtc cagcaatgtg	240
ggcagtggct tattcatcggt cctggctggaa acaggggctg ctggaggcct tgctgtgggt	300
ggcttcgagt ggaatgcaac ttttctgctt ctggccctgg gctggatctt tgtccctgtg	360
tacatcgtagt ctgggtgtggt caccatgcca cagtacactga agaaacgatt tggggggcag	420
aggatccagg tgtacatgtc agtcctgtct ctcatactct acatcttcac caagatatcg	480
actgatatact tctctggagc cctcttcatc cagatggcct tggctggaa tctctatctc	540
tccacagtca tcctgctgggt ggtgacagact gtctacacca ttgcaggggg cctcacagact	600
gtgatctaca cagatgctct acagaccgtg atcatggttt ggggagccct ggtcctcatg	660
tttctgggct ttcgggaggt cggctggta ccaggcttgc agcagctcta tagacagtccc	720
atccccaaatg tcacagttcc caacactacc tgcaccccttcc cacggcttgc tgccttccac	780
atgcttcgag atcctgtgaa cggggacatc ccctggccag gtcttatttt tggcctcaca	840
gtcttggcca cctgggtttt gtcacggac caggtgattt tgcagaggcct tctctcgcc	900
aagagtctt cacatgccaa gggaggatca gtgttaggg gctacctaata gatcctccca	960
atgttcttca ttgtcatgcc cggcatgatc agcagggccc tgtaccaga tgaagtcgccc	1020
tgtgtggacc ctgacatctg tcagagatgt tgtggggcca gagttggatg ctccaatatt	1080
gcctacccca aacttggatggt ggctctcatg cctgtgggtc tgcgaggcct gatgattgcc	1140
gtgatcatgg ctgcctcat gagctcactc acctccatct tcaacagcag tagcaccctg	1200
tttgcctatgg atgtgtggca gcgagtcgc aggaggcat cggagcaaga gctgatgggt	1260
gttaggcagg tttttgttgtt cttcctggta ctcatcagca tcctctggat ccccatcatc	1320
cagagctcca atagtggca gctcttgac tacatccaaat ccatcaccag ctacctagcc	1380
ccgccccatca cagccctt cctgctggcc atcttctgca agagggtcac tgagcctgg	1440
gccttctgg gcctcatgtt tggcctggta gtggaaatac tgcgtatgtat tctggaggc	1500
tcataactcag ccccagccctg tggggagaag gacaggcggc cagctgttct taaggacttc	1560
cactacctgt actttgccct cctcctctgt ggacttaccg ccatcatcat tgtcataatc	1620
agcttcttca cgagcccat ccccgacgaa aagcttgctc gcctgacccgt gtggacaagg	1680

agctgtccca tatctgaact acagaagaaa gtctctgtga gtgtgaacaa cacagagagt 1740  
gacaactctc cagcaactggc agggaggcca gtgatggagg gcactgcagg agatgagggaa 1800  
gaagcaaaca ccacacctaga gcctgaacaa ccagaagtcc tacacaggta ctgggggaaa 1860  
tggctgtgga actggttctg cgactctctt ggaacaccac agcaagcact gagcccagct 1920  
gagaaggctg agctggagca gaagctgacc agcatcgagg aagagccact ctggagatgt 1980  
gtctgcaaca tcaatgccat catcctgctg gccatcaaca tctttctctg gggctatttt 2040  
gcg 2043

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

cccgatgctt tccacatgct tc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

acaatgacct ggtctgtgca cc 22

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

&lt;400&gt; 9

acatcccttg gccaggtctc atttcgg

28

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 10

gggggccaga ggatccaggt gta

23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 11

gcaatcatca gccccgcag ac

22

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 12

agcaccctct tcaccatgga

20

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

aaacaacctt ccggcaatca t

21

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 14

ccaaggtccg caagagagca tctga

25

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

tgtgtcgtcc cttcagaatg tg

22

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

agaactagtt caggcaaaat atgcatg

27

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

His Asn Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro Trp Gly Cys

5

10

15

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

tgcacagacc aggtgattgt g

21

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

gcacggagcc tcccttg

17

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 20  
ctcgagcca acaattttc acatg 25  
<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 21  
atctctaatttccagcaatgtg 22  
<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 22  
accagcttgg ggtaggcaat 20  
<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 23  
ctcacagtct tggccacctg 20  
<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 24  
agaaccggct ctctctggag 20  
<210> 25  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Probe  
<400> 25  
tgcacggacc aggtgattgt gc 22  
<210> 26  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 26  
tctggagtca gcctgcacac ct 22  
<210> 27  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 27  
cagccttctc agctgggctc ag 22

<210> 28  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 28  
gggggccaga ggatccaggt gta 23  
<210> 29  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 29  
aaaatagccc cagaggaaga tggta 26  
<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 30  
atcctgactg ggtttgctt 20  
<210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Primer

<400> 31

atgctgatgc caatcagcac

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

agagctacga gctgcctgac

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

acatctgctg gaagggtggac

20

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

tgccacagta cttgaagaaa cgat

24

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

tgaagaacat tgggaggatt

20

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

caatgaagta ggagggtatg agg

23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

tggcgctgtt gaagatggag gtc

23

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

atctctaattc tccagcaatg tg	22
<210> 39	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 39	
gcaatcatca gccccgcag ac	22
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 40	
atcctgactg ggtttgcttt	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 41	
atgctgatgc caatcagcac	20
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>

<223> Primer

<400> 42

ggcaatggaa ccaggagtgt c

21

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

tcacgaaaaa tagccccaga gaaag

25

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

atggacagta gcaccttgag cc

22

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

tcaggcaaaa taggcattggc ag

22

<210> 46

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 46  
caatggAACCTGGAGGTTCA AG 22  
<210> 47  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 47  
tcacgaaaa TAGCCCCAGA GAAAG 25  
<210> 48  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 48  
atggacAGTA GCACCTTGAG CC 22  
<210> 49  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer

<400> 49

tcaggcaaaa taggcgtggc ag

22

【0089】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られた、消化管におけるヒトSGLTホモログの発現分布を示す。

【図2】実施例3で得られた、初代培養正常ヒト小腸上皮細胞におけるSGLT1, SGLTホモログの発現解析結果を示す。

【図3】実施例4で得られた、抗ヒトSGLTホモログ抗体によるヒト小腸切片の免疫染色結果を示す。

【図4】実施例5で得られた、糖尿病マウスにおけるSGLTホモログの発現変動の結果を示す。

【図5】実施例5で得られた、糖尿病ラットにおけるSGLTホモログの発現変動の結果を示す。

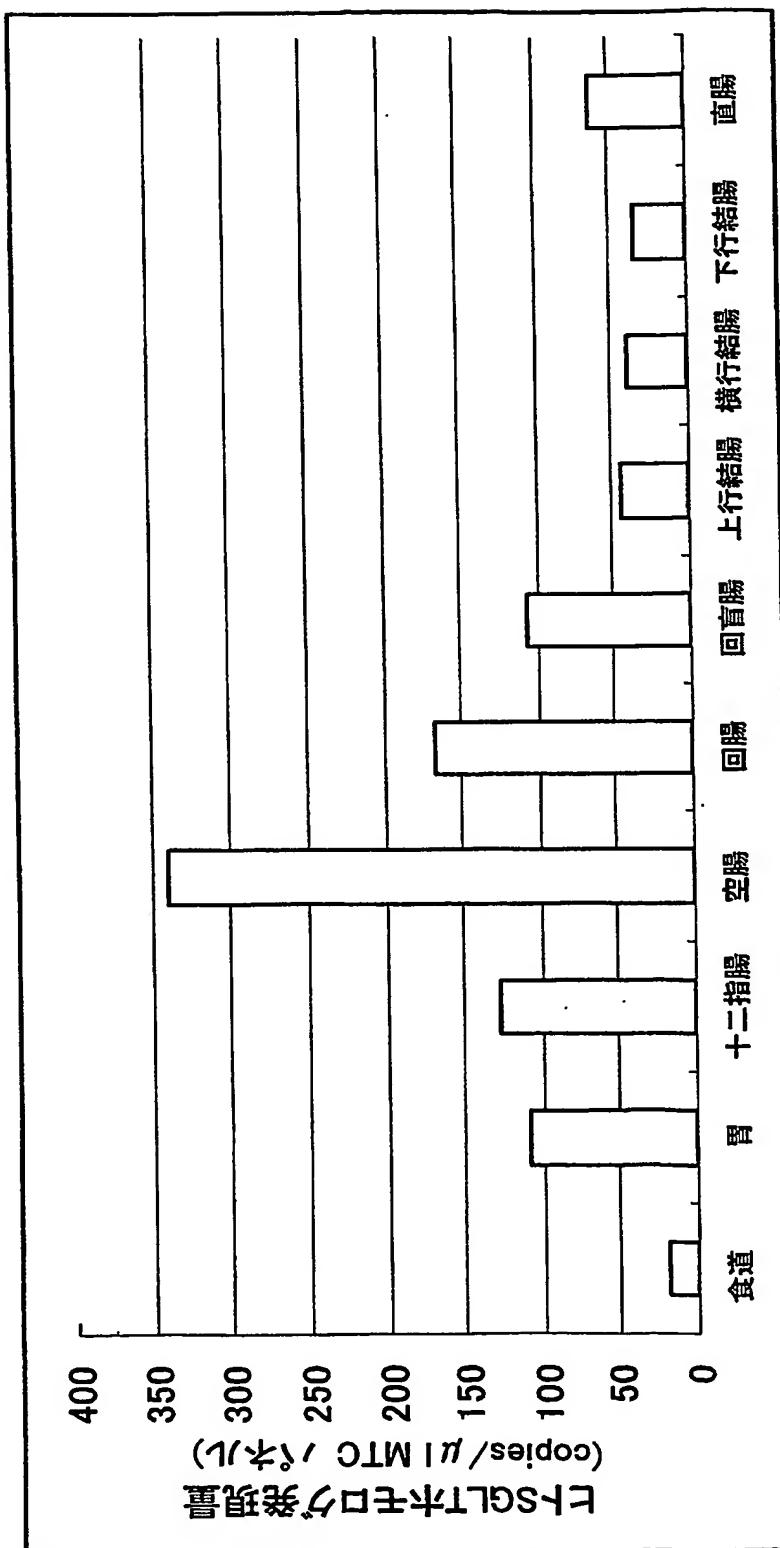
【図6】実施例6で得られた、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サルの小腸におけるSGLT1, SGLTホモログの発現を示す。

【図7】実施例7で得られた、マウス、ラット、ハムスター小腸器官培養系による糖取り込み量の測定結果を示す。

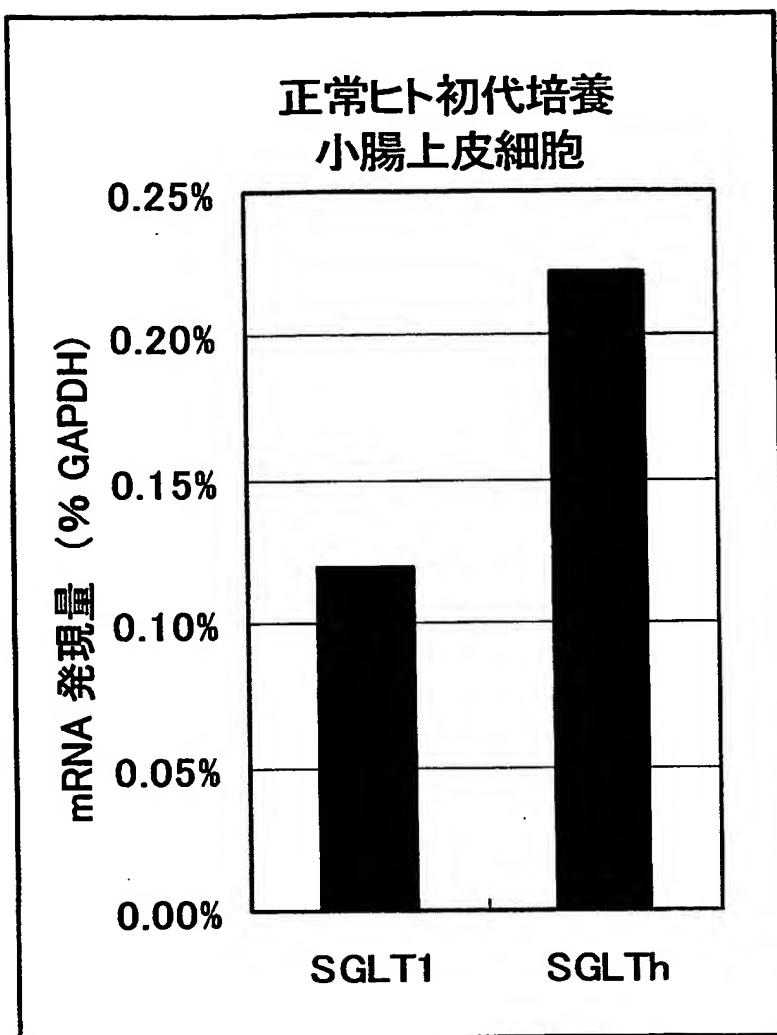
【書類名】

図面

【図 1】

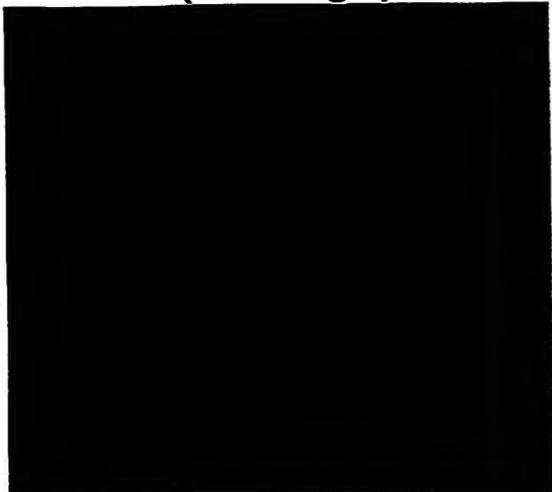


【図 2】

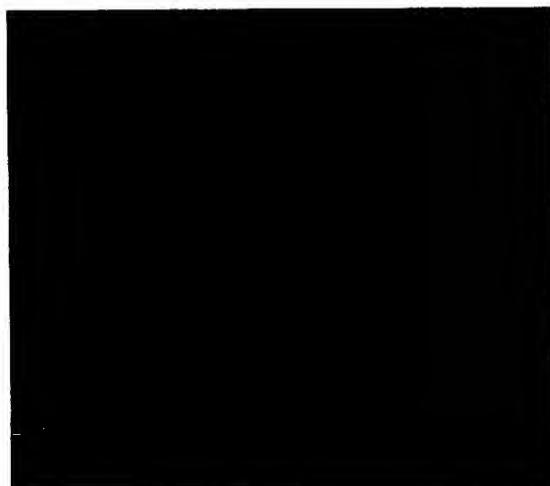
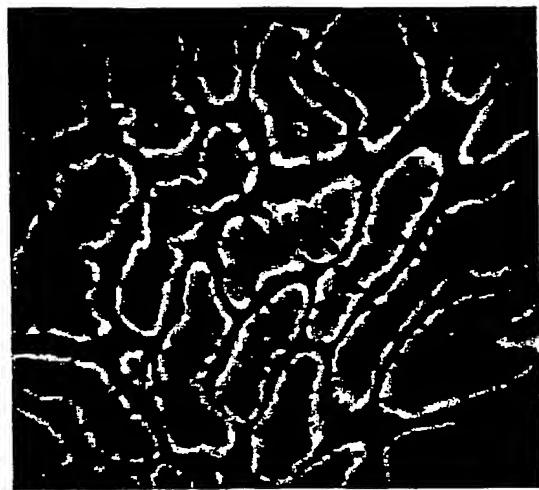


【図3】

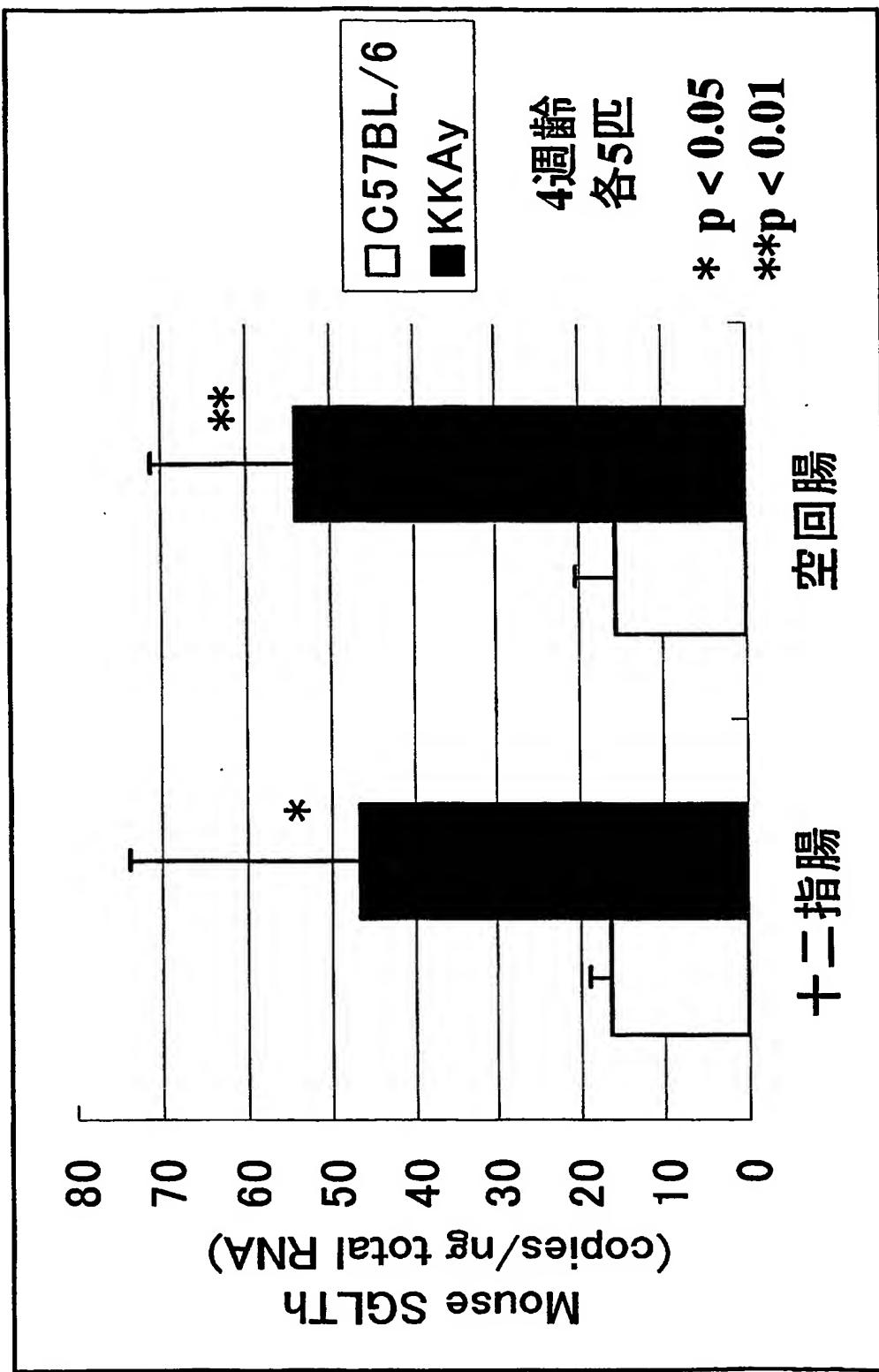
**Negative control  
(rabbit IgG)**



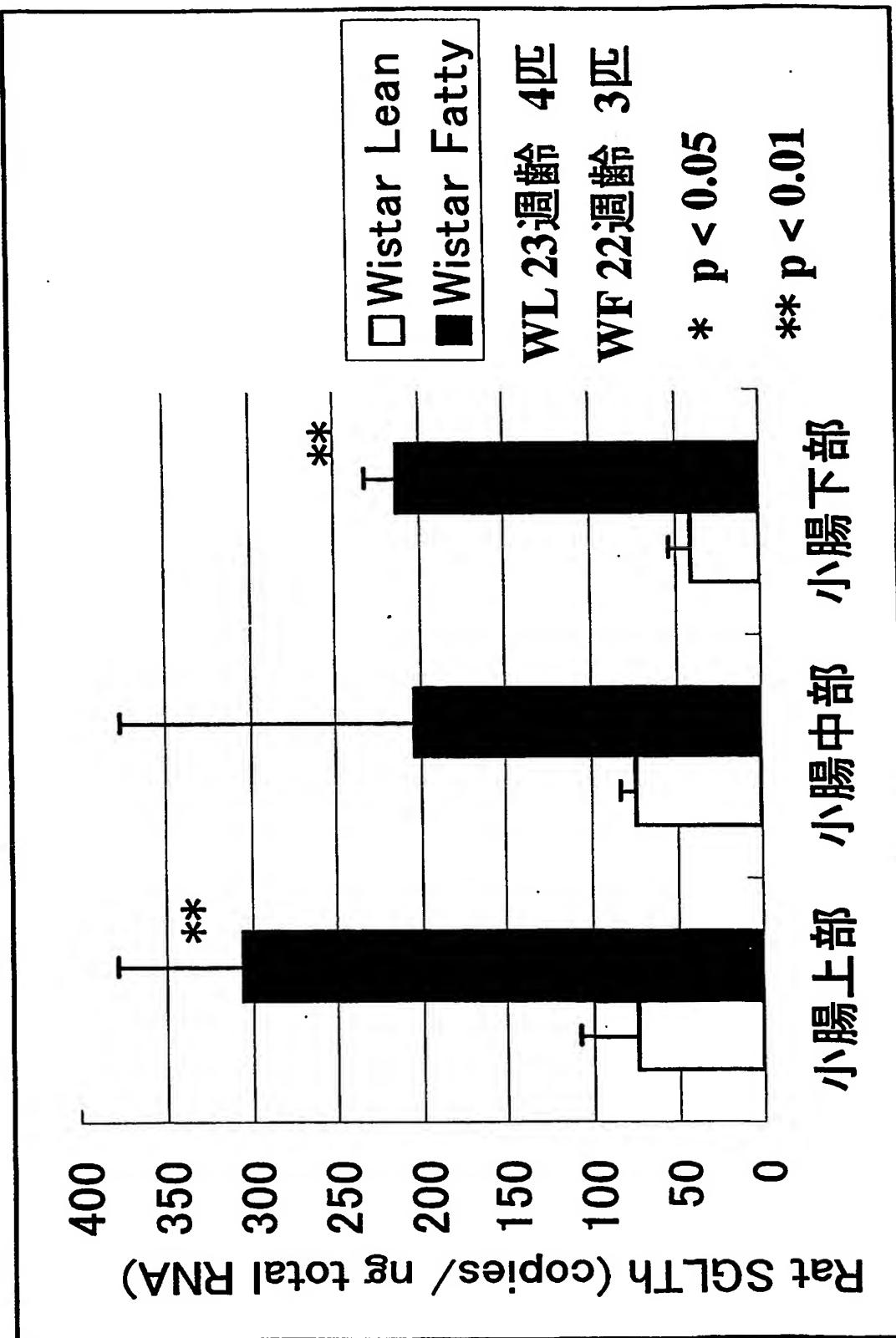
**SGLTh**



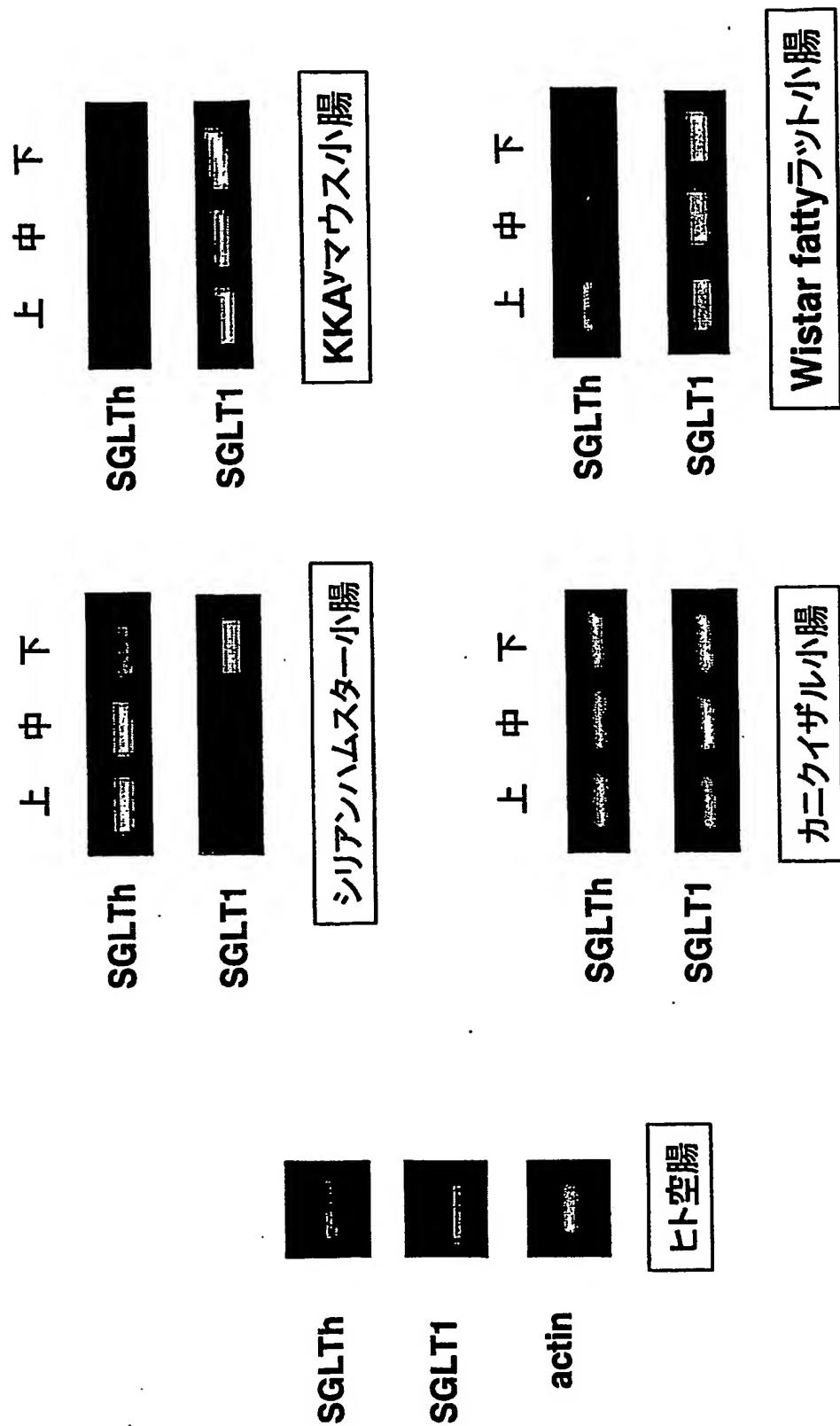
【図4】



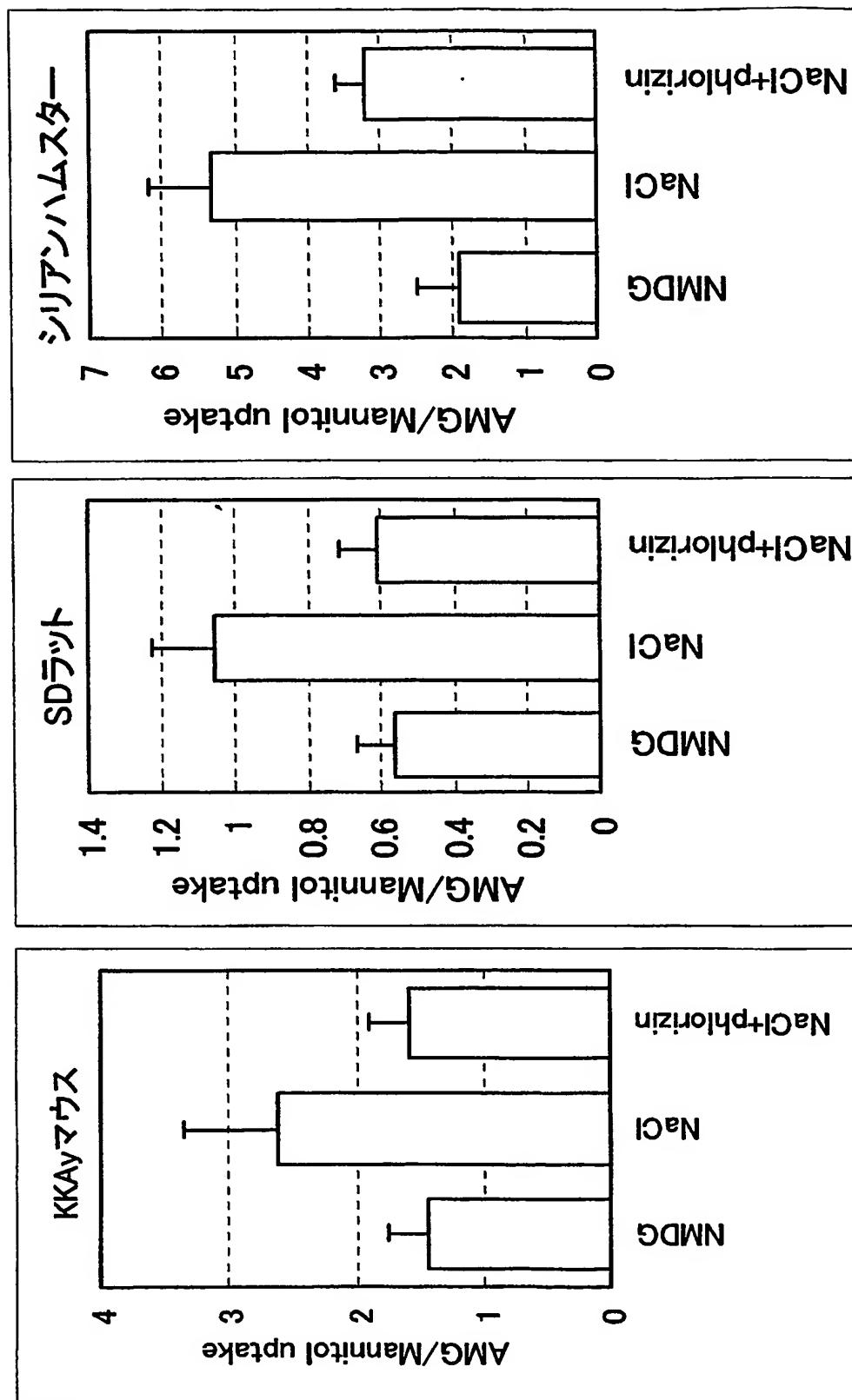
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 小腸でのグルコース取り込み阻害または促進剤の提供。

【解決手段】  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害または促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害または促進剤など。

【選択図】 なし

特願2003-156306

出願人履歴情報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
氏名 武田薬品工業株式会社